

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004301

International filing date: 11 March 2005 (11.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-094065
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14. 3. 2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月29日

出願番号
Application Number: 特願2004-094065

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2004-094065

出願人
Applicant(s): 学校法人 久留米大学

2005年 4月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋

【書類名】 特許願
【整理番号】 P04AC003
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A01K 67/00
G01N 33/15
A61K 45/00

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県筑紫野市美しが丘南 1-8-7
【氏名】 星野 友昭

【発明者】
【住所又は居所】 福岡県福岡市東区香椎駅東4丁目57-45
【氏名】 相澤 久道

【特許出願人】
【識別番号】 599045903
【氏名又は名称】 学校法人 久留米大学

【代理人】
【識別番号】 100113044
【弁理士】
【氏名又は名称】 木島 智子

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 175973
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 委任状 1

【援用の表示】 平成16年3月19日付け提出の包括委任状を援用致します。

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤。

【請求項2】

プロテアーゼがメタロプロテアーゼである、請求項1記載のプロテアーゼ阻害剤。

【請求項3】

プロテアーゼがエラスターーゼである、請求項1記載のプロテアーゼ阻害剤。

【請求項4】

レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】プロテアーゼ阻害剤及び慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性閉塞性肺疾患の病因の一つと考えられるプロテアーゼの阻害剤、及び慢性閉塞性肺疾患の治療剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

慢性閉塞性肺疾患Chronic Obstructive Pulmonary Disease: (以下、「COPD」と記載する。)とは、肺気腫、慢性気管支炎、あるいは両者の併存により、進行性の閉塞性換気障害を特徴とする疾患である。COPDにおける気流制限は、末梢気道病変における気道抵抗上昇と肺気腫による肺弾性収縮力低下に因り、2者の関与の程度は症例によって様々ではあるが、本邦のCOPD患者の多くは肺気腫優位の傾向を示す。肺気腫の最大のリスクファクターが喫煙である事は多くの疫学的研究より明らかである。2001年に米国National Heart, Lung and Blood Institution (NHLBI)とWorld Health Organization (WHO)との共同で報告されたGlobal Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)にも述べてあるように、1990年の調査では世界でのCOPDの罹患率は男性で9.34/1000、また女性では7.33/1000となっており、罹患率が非常に高い疾患である。現時点でのCOPDによる呼吸不全が原因の死亡は、アメリカの死因の4位と推定されている。また、日本における厚生労働省の報告でもCOPDによる死亡率は、最近の30年間で約4倍に増加した。COPD治療薬として従来知られているのは、気管支拡張剤とステロイドもしくはこの組み合わせである。しかしながらあまり効果がなく、新規の治療薬が求められている。

。

【0003】

このため、COPDの根治的治療薬及び治療法はいまのところ確立されていない。

【0004】

【非特許文献1】Pauwels, R. A., Buist, A. S., Calverley, P. M., Jenkins, C. R., and Hurd, S. S. "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary." 「American journal of respiratory and critical care medicine」, vol.163: PP.1256-1276, 2001.

【非特許文献2】Barnes, P. J. "Novel approaches and targets for treatment of chronic obstructive pulmonary disease." 「American journal of respiratory and critical care medicine」, vol.160: S72-79, 1999.

【0005】

一方、エラスターーゼは、肺を構成する弾性線維 (elastic fiber) の主成分である不溶性タンパク質エラスチンを加水分解するプロテアーゼとして知られている。このエラスターーゼは、気管内へ投与することによって、COPDの一種である肺気腫を誘導することが古くから知られており、エラスターーゼ投与動物が、肺気腫の動物モデルとして用いられている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

我々は、かかる状況に鑑み、エラスターーゼ等に代表されるプロテアーゼの阻害が、COPDの一種である肺気腫の治療に役立つのではないかという仮説に基づき、プロテアーゼ阻害剤を探索し、また得られたプロテアーゼ阻害剤であるTRXが、実際にCOPDを強力に抑制することを見出し、本発明を完成するに至ったものであって、その目的とするところは、エラスターーゼを含むプロテアーゼの阻害剤、引いてはCOPDの根治的治療薬及び治療法を提供するにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述の目的は、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼの阻害剤、又はCOPDの予防又は治療剤によって達成される。

【発明の効果】

【0008】

本発明のプロテアーゼ阻害剤、及びCOPDの予防又は治療剤は、COPDを強力に抑制することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

〈本発明のプロテアーゼ阻害剤、及びCOPDの予防又は治療剤〉
本発明のプロテアーゼ阻害剤、及びCOPDの予防又は治療剤の有効成分として用いられるものとしては、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子単独の他、これらの組み合わせ等が挙げられる。

【0010】

レドックス活性蛋白質とは、レドックス（酸化と還元、reduction-oxidation）の両方の活性を有することによって、レドックス制御（酸化還元状態を調節すること）のできる蛋白質であり、レドックス活性ペプチド等をも含むものである。例えば、チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド類や、HO-1（ヘムオキシゲナーゼ-1）等が挙げられる。

【0011】

チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド類とは、チオレドキシン（以下「TRX」と記載する。）ファミリーに属するポリペプチド類（以下、「TRX-P」と記載する。）とは、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を有するポリペプチド類であって、もともと、生物細胞中に存在するポリペプチド類である（特開2002-179588等参照）。

【0012】

本発明で言う「TRX-P」には、天然のヒトを含む動物、植物、大腸菌、酵母からの抽出ポリペプチド類以外に、遺伝子組み換えにより酵母や大腸菌等から抽出されるポリペプチド類、化学合成で作成されるポリペプチド類等も含まれる。

【0013】

但し、ヒト由来のもの、及びそれを大腸菌、酵母において遺伝子組み換えで作成したもの、及びそれらと同一又は類似の配列からなる合成ペプチドが、生体に与える影響がより少ないと考えられるため好ましい。

【0014】

TRX-Pは、システィン残基を含む活性部位（-Cys-X1-X2-Cys-：X1、X2は、アミノ酸残基を表し、同一であっても異なるものでも良い。）を有し、類似の3次元構造を持つ分子群である。

【0015】

従って、本発明で言う「TRX-P」には、上記の他、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を損なわない範囲で、一部のアミノ酸が欠失又は置換されたものや、他のアミノ酸、ペプチドが融合されたものであっても良い。

【0016】

活性部位の具体例としては、-Cys-Gly-Pro-Cys-、-Cys-Pro-Tyr-Cys-、-Cys-Pro-His-Cys-、-Cys-Pro-Pro-Cys-等が挙げられるが、中でも、-Cys-Gly-Pro-Cys-が、種を超えて保存されている配列であるため、マウスモデルによる実験結果の人間への応用がより確実であるという理由で好ましい。

【0017】

「TRX-P」には、具体的には、例えば、活性部位が-Cys-Gly-Pro-Cys-であるチオレドキシン（TRX）、グルタレドキシン等が挙げられる。

【0018】

TRXには、ヒト、大腸菌、酵母由来のものがあり、グルタレドキシンには、ヒト、大腸菌由来のものがある。

【0019】

ヒト細胞から「TRX-P」を抽出する具体的な方法としては、以下の方法が例示される。

- (A) ヒト由来の細胞株から抽出する方法（特開平1-85097号公報等参照）。
- (B) 遺伝子組み換え法を用いる方法（特開平1-85097号公報等参照）。
- (C) ペプチド合成法を用いる（特開平5-139992号公報等参照）。

【0020】

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤中の、有効成分の含有量は、剤形によって様々であり、一概に限定できず、各種剤形化が可能な範囲で、投与量との関係で適宜選択すれば良いが、例えば液剤の場合、0.0001～10 (w/v %)、好ましくは0.001～5 (w/v %)、特に注射剤の場合、0.0002～0.2 (w/v %)、好ましくは0.001～0.1 (w/v %)、固体剤の場合、0.01～50 (w/v %)、好ましくは0.02～20 (w/v %)等として調製できるが、必ずしもこの範囲に限定されるものでは無い。

【0021】

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤の投与量は、投与経路、症状、年齢、体重、予防又は治療剤の形態等によって異なるが、例えば、プロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤中の有効成分の量が、体重1kg当たり0.005～500mg、好ましくは、0.1～100mg、但し、成人に対して1日あたり、下限として0.01mg（好ましくは0.1mg）、上限として、20g（好ましくは2000mg、より好ましくは500mg、更に好ましくは100mg）となるように、1回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

【0022】

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤の有効成分としては、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子の中の一種を単独で用いる他、二種以上組み合わせて用いることができる。

【0023】

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤は、従来知られている肺疾患の予防又は治療成分との合剤としても良い。その予防又は治療成分としては、以下の1.～5.等が挙げられる。

【0024】

1. メディエーターアンタゴニスト：

例えば、LTB4 antagonists（例えばLY29311, SC-53228, CP-105,696, SB201146, BIIL284）、5'-Lipxygenase inhibitors（例えばzileutin, Bayx1005）、Chemokine inhibitors、IL-8 antagonists（例えばSB225002; CXCR2 antagonists）、TNF inhibitors（例えばmonoclonal Ab, soluble receptors, MMP inhibitors）、Antioxydants（例えばNAC, NAL, グルタチオン、スーパーオキシドジスムターーゼ等）、Prostanoid inhibitors（例えばCOX-2 inhibitors, thromboxane antagonists、isoprostane receptor antagonists）、iNOS inhibitor等

【0025】

2. 抗炎症剤：

例えば、Phosphodiesterase 4 inhibitors（例えばSB207499, CP80633, CDP-840）、NF- κ B inhibitors（例えばI- κ B kinase inhibitors, IkBa gene transfer）、Adhesion inhibitors（例えばanti-CD11/CD18, anti-ICAM1, E-selectin inhibitors）、Prostaglandin E analogs（例えばmisoprostil, butaprost）、サイトカイン（例えばIL-10）、p38 MAP kinase inhibitors（例えばSB203580, SB220025, RWJ67657）、Colchicine、Macrolide antibiotics（例えばerythromycin, clarithromycin, roxithromycin）等

【0026】

3. プロテアーゼインヒビター：

例えば、Neutrophil elastase inhibitors (例えばICI200355, ONO-5046, MR-889, L658, 758)、Cathepsin inhibitors (例えばsuramin)、Matrix metalloprotease inhibitors (例えばbatimastat, marimastat, KBR7785)、alpha1-antitrypsin (例えばpurified, human recombinant, gene transfer)、Secretory leukoprotease inhibitor、Elafin等

【0027】

4. Immunoregulators：

例えば免疫抑制剤FK506等

【0028】

5. 呼吸器炎症疾患又は呼吸器過敏症治療剤：

テオフィリン等のキサンチン誘導体、 β 受容体刺激剤、抗コリン剤、抗アレルギー用剤、副腎皮質ホルモン剤及び吸入ステロイド等のステロイド剤等。

【0029】

また、本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤には、その阻害効果や予防又は治療効果を阻害しない範囲で、他の成分を含有させることができ、例えば薬学的に許容される担体として、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、乳化剤、可溶化剤、吸収促進剤、保湿剤、吸着剤、充填剤、增量剤、付湿剤、防腐剤等の添加剤を用いて周知の方法で製剤化することができる。

【0030】

ここに、賦形剤としては、有機系賦形剤及び無機系賦形剤等が挙げられる。

【0031】

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤は、主に経口投与するためのものであるが、具体的には、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ、もしくはシロップ剤等の形態で、経口投与される。

【0032】

投与形態としては、経口投与のほか、静注等の静脈投与、筋肉内投与、経皮投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、直腸内投与、粘膜投与、吸入等が挙げられるが、静注等の静脈投与が安全かつ血中濃度を一定に保つという点で好ましい。

【0033】

尚、上述のレドックス活性蛋白質をコードする遺伝子を、遺伝子療法における、プロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防・治療剤として用いることもできる。

【0034】

〈本発明の阻害剤や予防又は治療剤を用いた、プロテアーゼ阻害方法、及びCOPDの予防又は治療方法〉

本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤を、上記のような様々な形態で投与すること、あるいは、本発明のプロテアーゼ阻害剤やCOPDの予防又は治療剤である遺伝子を、遺伝子治療によって用いることによって、予防又は治療することができる。

【0035】

〈本発明の効果確認に用いる肺気腫モデルの作製方法〉

本発明において、COPD抑制効果の確認のために用いる肺気腫モデルは、文献記載の方法を用いることができるが (Shapiro, S. D. Animal models for COPD. Chest, 117: 223S-227S, 2000)、具体的には、例えば清潔PBSに懸濁した豚エラスターを、シリソジで気管内投与すること等によって作製することができる。

【実施例1】

【0036】

伝統的なCOPD動物モデルを使って、COPD治療剤の効果を確認する実験を行った。8週齢C57BL/6Nマウスを下記1～4の各群について5匹ずつ用いた。

【0037】

(第1群) DAY 1に、清潔PBS 100 μ Lをシリソジで気管内投与した群 (参考例: contr

olマウス)。

(第2群) DAY1に、清潔PBS 100 μ Lに懸濁した豚エラスター γ (SIGMA社製、0.3U)をシリンジで気管内投与した群(比較例1：病態モデルマウス1)。

(第3群) DAY0からDAY20まで隔日で、TRX投与のコントロールとして清潔PBS 100 μ Lに懸濁した卵白アルブミン(OVA, SIGMA社製、40 μ g)を腹腔内投与し、清潔PBS 100 μ Lに懸濁した豚エラスター γ (SIGMA社製 カタログ番号E1250、0.3U)を、DAY1にシリンジで気管内投与した群(比較例2：病態モデルマウス2)。

(第4群) DAY0からDAY20まで隔日で、清潔PBS 100 μ Lに懸濁したヒトリコンビナントTRX(40 μ g)を腹腔内投与し、清潔PBS 100 μ Lに懸濁した豚エラスター γ (SIGMA社製 カタログ番号E1250、0.3U)をDAY1にシリンジで気管内投与した群(実施例1：病因+治療剤投与マウス)。

【0038】

すべてのマウスはDAY21で回収した。20%中和ホルマリンを気管支から15cmH20圧をかけてマウス肺を還流固定。肺パラフィン切片はHE染色した。顕微鏡画像は顕微鏡用デジタルカメラDXM1200(NIKON製)で取り込み、解析ソフトはACT-1

(NIKON製)、Photoshop(Adobe社製)で用いた。具体的には各群からランダムに肺組織(スライド)を選ぶ。一匹のマウスの両肺から左右の上肺野、中肺野と下肺野の計6断面のHE染色スライドから各断面5視野の画像をACT-1で取り込む。Photoshop(Adobe社製)を用いて各視野で300マイクロメーターのグリッド(線)4つ引く。肺胞がこのグリッドを横切った数を数える。例えば3回横切ると平均の肺胞の長さ(means linear intercept: Lm)は300マイクロメーター/3=100マイクロメーターである。一匹のマウスのLmを6断面×5視野×4グリッド(線)=120グリッド(線)から求め各群の平均及びWelchのt検定で統計解析を行った。

【0039】

組織学的に(第1群：controlマウス)には肺に有意な変化はなかった(図1)。

【0040】

一方、(第2群：病態モデルマウス1)には著明に肺胞腔が広がり、実験病理学的COPDが出来た(図2)。

【0041】

また、(第3群：病態モデルマウス2)は、著明に肺胞腔が広がり、実験病理学的COPDが出来るが、第2群と差がなかった。つまりレドックス蛋白でないコントロール蛋白OVA腹腔内投与ではCOPDの発症は抑制されないことが判明した(図3)。

【0042】

(第4群：病因+治療剤投与マウス)では、肺に変化は少なく、TRXがCOPDを強力に抑制することが分かった(図4)。

【0043】

そこで、これらHE染色スライドを用いて画像解析を行い、Lmを求めたところ、第1群、第2群、第3群、第4群のLmの平均はそれぞれ31.7, 69.0, 82.0, 30.4マイクロメーターだった(図5)。

【0044】

Lmを計測すると、第4群(病因+治療剤投与マウス)は、第2群(病態モデルマウス1, p=2.62x10e-24)、第3群(病態モデルマウス2, p=4.00x10e-20)に比べ有意にCOPDを統計学的に抑制した。

【0045】

一方、第4群(病因+治療剤投与マウス)は、第1群(controlマウス)に比べLmに有意差はなかった。

【0046】

つまり、この系を用いてレドックス活性蛋白質であるTRXが、COPDを強力にかつ統計学的に有意に抑制することが確認された。

【0047】

また、レドックス活性蛋白質が、エラスターーゼによって誘導される肺気腫モデルのCOPDを抑制することから、このレドックス活性蛋白質が、エラスターーゼ阻害剤として機能していることが確認された。つまり、レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子が、エラスターーゼやメタロプロテアーゼ等のプロテアーゼを阻害する効果を有することは明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】第1群（controlマウス）の肺組織の顕微鏡画像である（HE染色、 $\times 40$ 倍）

【図2】第2群（病態モデルマウス1）の肺組織の顕微鏡画像である（HE染色、 $\times 40$ 倍）

【図3】第3群（病態モデルマウス2）の肺組織の顕微鏡画像である（HE染色、 $\times 40$ 倍）

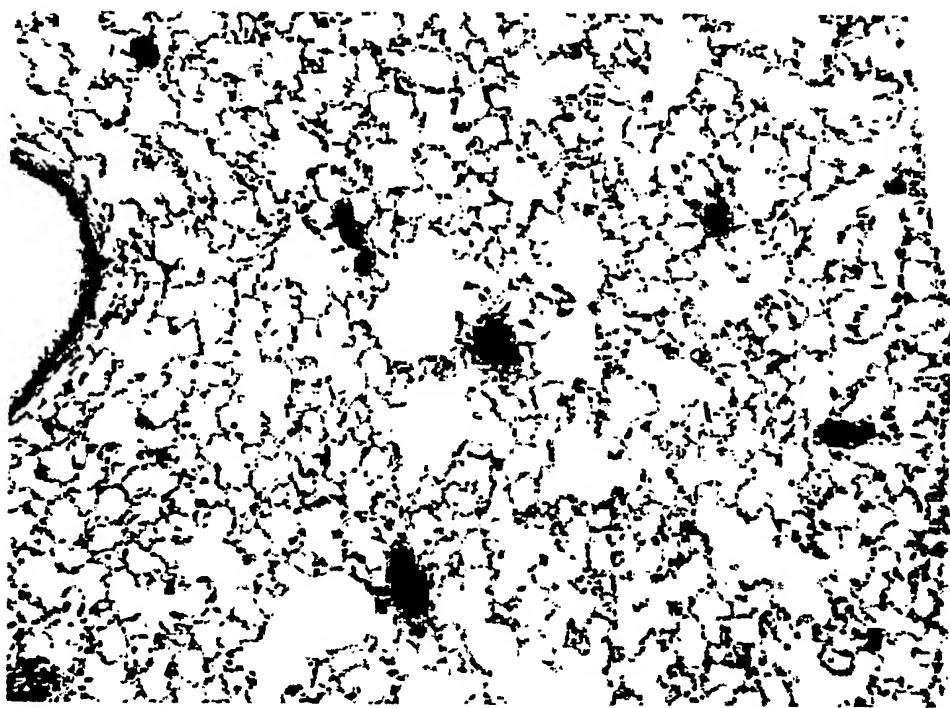
【図4】第4群（病因+治療剤投与マウス）の肺組織の顕微鏡画像である（HE染色、 $\times 40$ 倍）

【図5】第1～4群のマウスの、平均の肺胞の長さ（mean linear intercept: Lm）を表す図である。

【書類名】図面

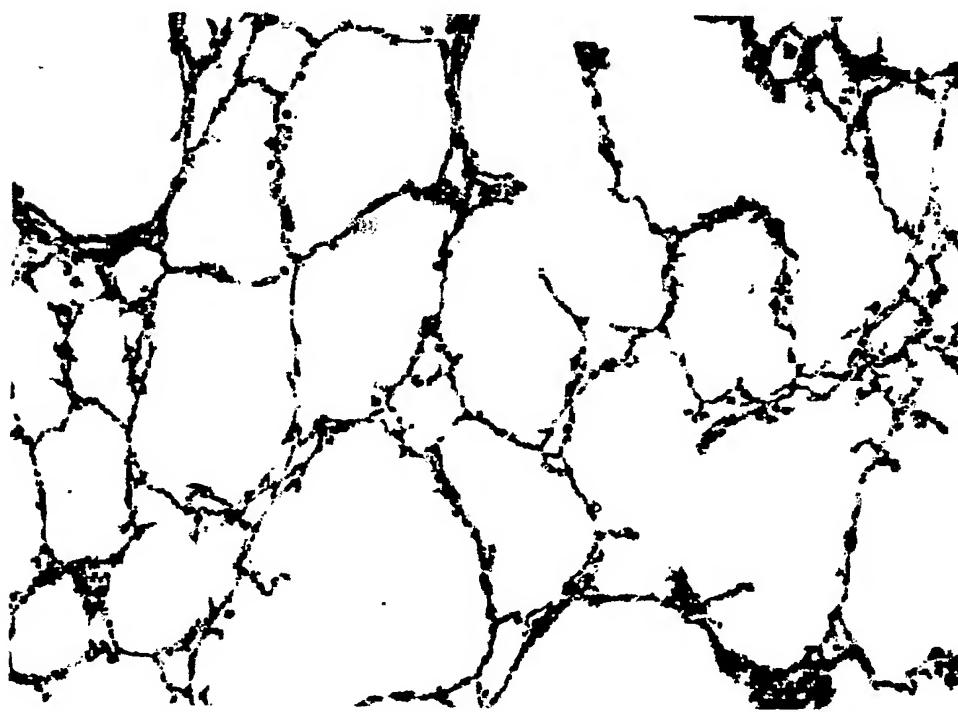
【図1】

HE染色, ×40倍



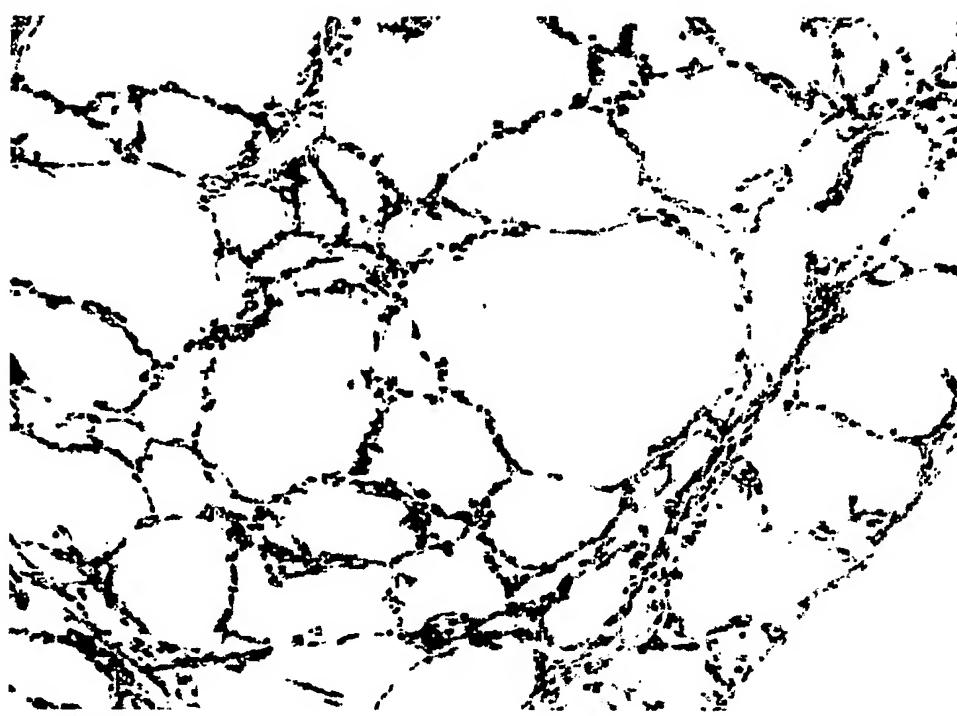
【図2】

HE染色, ×40倍



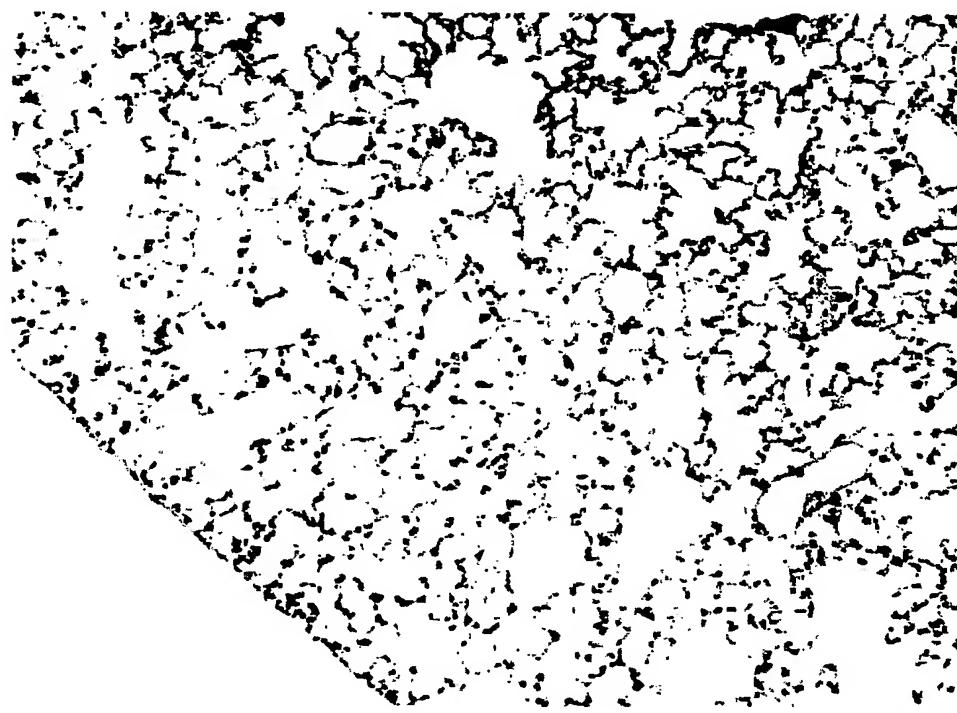
【図3】

HE染色, ×40倍

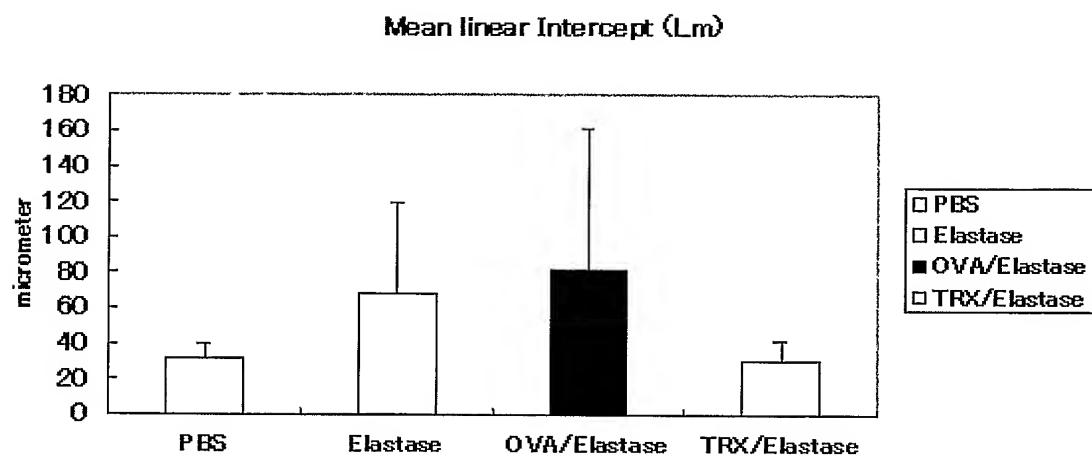


【図4】

HE染色, ×40倍



【図5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】新たなプロテアーゼ阻害剤、COPDの根治的治療薬及び治療法を提供すること。

【解決手段】レドックス活性蛋白質、又はこれらをコードする遺伝子から選択される、少なくとも一種以上を含むことを特徴とする、プロテアーゼ阻害剤、及び慢性閉塞性肺疾患の予防又は治療剤である。

【選択図】なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-094065
受付番号	50400512940
書類名	特許願
担当官	滝澤 茂世 7299
作成日	平成16年 4月26日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 3月29日
-------	-------------

特願 2004-094065

出願人履歴情報

識別番号

[599045903]

1. 変更年月日

1999年 3月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県久留米市旭町67番地

氏 名

学校法人 久留米大学